

拟南芥转录共激活子 ANGUSTIFOLIA3(AN3)
调控花的雄蕊的形成

李 丹 徐梦珂 蒋继宏 孟来生*

(江苏师范大学江苏省药食植物生物技术国家重点实验室培育点/生命科学学院,徐州 221116)

摘 要 雄蕊是种子植物产生花粉的重要生殖器官,其是否正常发育关乎到植物的繁殖状况,并且会对农作物的产量造成影响。通过 RT-PCR 技术鉴定拟南芥转录共激活子 ANGUSTIFOLIA3(AN3)的两个敲除突变体 *an3-1* 和 *an3-4* ;通过形态学检测发现,突变体 *an3-1* 和突变体 *an3-4* 的雄蕊较野生型雄蕊短,而雌蕊却无明显变化;通过构建 AN3 启动子 GUS 表达载体,对 *Pro-AN3-GUS* 植株的花组织进行染色,并观察,结果表明 AN3 基因在拟南芥的種子胚、成熟的花粉、柱头、花瓣中均有表达。这个结果证明 AN3 能在拟南芥生殖生长期间在花器官等重要组织中表达,这个结果与 *an3-1* 和 *an3-4* 的雄蕊变短的结论一致。由此,我们得出结论:拟南芥转录共激活子 AN3 正向调控花的雄蕊的形成。

关键词 ANGUSTIFOLIA3(AN3)突变体;雄蕊;调控

中图分类号:Q944.57 文献标志码:A doi :10.7525/j.issn.1673-5102.2018.02.013

Arabidopsis thaliana Transcription Coactivator ANGUSTIFOLIA3(AN3)
in Regulating the Stamen Formation

LI Dan XU Meng-Ke JIANG Ji-Hong MENG Lai-Sheng*

(The Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plant of Jiangsu Province ,College of Life Science ,Jiangsu Normal University ,Xuzhou 221116)

Abstract Stamens are important reproductive organs which produce pollen in seed plants , and their normal development is related to the reproductive status of plants and affects the yield of crops. Two knockout mutants *an3-1* and *an3-4* of *Arabidopsis thaliana* transcription coactivator ANGUSTIFOLIA3(AN3) were identified by RT-PCR. By morphological examination ,the stamens of the *an3-1* and *an3-4* mutants were shorter than those of wild-type , whereas , the pistils were not changed significantly. By constructing AN3 promoter with GUS expression vector , the flower tissues of obtained *Pro-AN3-GUS* plants were stained and observed. The AN3 promoter in *Arabidopsis* seed embryos , mature pollen , stigma , petals was expressed. AN3 could be expressed in important tissues such as floral organs during *Arabidopsis* reproductive growth. These above results are consistent with the short stamens of *an3-1* and *an3-4* mutants. Thus , AN3 positively regulates the stamen development of *A. thaliana*.

Key words ANGUSTIFOLIA3(AN3) mutant ;stamens ;regulation

花是被子植物主要的繁殖器官,在繁育后代的过程中,发挥着极其重要的作用^[1],而授粉是种子植物繁殖发育必经的过程,植物的雄蕊是种子

植物产生花粉的器官,雌蕊是种子植物的雌性繁殖器官,雌蕊的柱头有粘液可以粘附花粉^[2],花粉落到雌蕊的柱头上^[3]就开始生长,穿过雌蕊到达

基金项目:徐州市农业科技项目(农业高技术攻关项目 KC16NG063)

第一作者简介:李丹(1992—),女,硕士研究生,主要从事分子生物学研究。

* 通信作者 E-mail :menglsh@jsnu.edu.cn

收稿日期:2017-05-08

Foundation item :Agricultural science and technology(agricultural high-tech research project)(KC16NG063)

First author introduction :LI Dan(1992—) female ,master ,mainly engaged in molecular biology research.

* Corresponding author E-mail :menglsh@jsnu.edu.cn

Received date:2017-05-08

子房与卵子结合 ,并发育形成种子。植物的花能否正常授粉直接影响到作物的产量和传种 ,其雄蕊和雌蕊的正常发育是重要因素 ,研究基因调控雄蕊发育对改良农作物育种及增加产量具有十分重要的意义。

拟南芥 *ANGUSTIFOLIA3(AN3)*与编码人转录共激活因子和滑膜肉瘤易位蛋白(SYT)是同源基因^[4]。AN3 是拟南芥^[3]中一个小基因家族的成员 ,有许多重要功能 ,如涉及调节叶原基中的细胞增殖 ,近远轴面的决定和建立子叶同一性^[3~6]。AN3 的表达仅限于叶肉细胞内 ,在叶片表皮细胞内未检测到^[5]。AN3-MIN3 基因级联可通过调控种子胚胎发育控制细胞分裂和细胞伸长^[7]。AN3 是涉及调节叶片和花瓣的生长以及形状的组成部分^[8]。最近 ,我们的研究发现 AN3 转录共激活子在种子发育^[7] ,花青素生物合成^[9] ,根系统发育^[10] ,干旱胁迫和水分利用^[11]等方面都发挥着重要作用。AN3 的这些功能表明它参与拟南芥生长发育 ,代谢和非生物胁迫等重要生理过程 ,是一个重要的遗传因子。然而 AN3 基因是否调控拟南芥花的雄蕊发育目前尚未研究。

本研究发现突变体 *an3-1* 和 *an3-4* 植株的雄蕊均比野生型短 ,而雌蕊却无明显变化。AN3 的 GUS 染色实验表明 ,AN3 基因在花器官中明显表达。综合以上结果 ,我们得出结论 ,AN3 基因参与调控拟南芥花的雄蕊形成。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验植物

本研究所用到的拟南芥材料均为哥伦比亚 (Columbia)生态型背景 ,有拟南芥野生型 Col-0、*an3-4* 敲除突变体[由 G. Horiguchi 教授(日本丰岛市立兴大学)热情提供] ,*an3-1(CS241)*敲除突变体[购自拟南芥生物研究中心(ABRC)(俄亥俄州立大学 ,俄亥俄州哥伦布市)提供]。AN3 基因敲除靶位点引物序列设计 ,AN3 基因敲除所用的载体 构建的情况请参看^[3]。

1.1.2 实验试剂

UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒 ; AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒 ;PCR(Taq)扩增试剂盒。以上试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 拟南芥的培养

将野生型和突变体拟南芥的种子在 4℃ 下进行处理 3 天后 ,以 2.5% 次氯酸钠消毒 10 min 后 ,用高温高压灭菌的去离子水荡洗 4 次 ,播种在含 1% 蔗糖和 0.8% 琼脂且 pH5.8 的 MS 培养基上 ,并在 21 ±2℃ ,16 h/8 h 光暗周期 ,光照强度 6 000 ~ 8 000 lx ,湿度 75% 的环境中培养 ,每天观察。待幼苗长出 4 片左右真叶后 ,便将其移栽到浸透 MS 营养液的灭菌的基质土中 ,同等温度、光照和湿度的条件下继续培养 ,每周浇一次 MS 营养液^[12]。

1.2.2 RT-PCR 检测 AN3 基因的表达量

通过 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒 ,利用孟^[11~12]等人描述的方法 ,从待测样品叶片中提取总 RNA ,使用 AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒对总 RNA 进行逆转录 ,产生的 cDNA 用作基于 RT-PCR 的基因表达分析的模板进行 PCR 扩增。使用的引物如下 :

TUB4 (F-GACGCTTCATCTCGTCC ; R-GTA-AACGTAGGTGAGTCCA) ;AN3(F-5'-GCCTCAGC-CACCAAGTGTGCAT-3' and R-5'-ACCGCCACCAC-CACTTCCCA-3')。

1.2.3 花的雄蕊和雌蕊长度测量方法

使用 HIROX 三维视频显微镜在相应放大倍率下拍摄花的雄蕊和雌蕊 ,通过扫描器官形成数字图像 ,然后使用 Image J 软件测量雄蕊和雌蕊的长度。

1.2.4 AN3 基因敲除靶位引物序列设计

AN3 F-5'-GCC TCA GCC ACC AAG TGT GCA T-3' ,R-5'-ACC GCC ACC ACC ACT TCC CA-3'。

1.2.5 拟南芥 AN3 启动子 GUS 表达载体构建

通过启动子分析 ,插入 2.0 kB 的启动子片段构建拟南芥 AN3(At5g28640)启动子-GUS 表达载体 ,扩增引物为(P1-ggg gac aag ttt gta caa aaa agc agg ct TTT GTA AGC GTT TCA GAA TCC T ,P2-ggg gac cac ttt gta caa gaa agc tgg gt TAA CTA TTG AAG ATG TGT ATC TC)。并将这些片段插入到 *pCB308R* 质粒中^[11~12]。之后 ,浓杆菌转化拟南芥植物 ,抗生素卡纳霉素筛选转基因苗 ,从而获得 *Pro-AN3-GUS* 植株。

1.2.6 GUS 染色

β-葡萄糖苷酸酶(GUS) ,使用混合缓冲液(1 mmol · L⁻¹ X-gluc ,60 mmol · L⁻¹ NaPO₄ 缓冲液 , 0.4 mmol · L⁻¹ K₃ Fe(CN)₆/K₄ Fe(CN)₆ 和 0.1%

(v/v) Triton X-100) 将样品(*Pro-AN3-GUS*)染色 , 然后在 37℃ 下培养 8 个小时。GUS 染色后 ,使用 30%、50%、70%、90% 和 100% 浓度梯度的乙醇约 30 分钟处理每个样品 ,使其除去叶绿素^[12~13]。最后 ,使用 HIROX 三维视频显微镜在相关放大倍数下拍摄材料^[14]。

2 结果与分析

2.1 野生型与突变体 AN3 基因的表达

以持家基因 *TUB4* 作为对照进行 RT-PCR ,扩增循环数为 30。由图 1 可知 ,野生型拟南芥(WT)中明显扩增出了 300 bp 的片段 ,则表明 WT 中 *AN3* 基因正常表达 ,突变体 *an3-1* 中没有扩增条带 ,说明该突变体中 *AN3* 基因的表达缺失 ,则突变体 *an3-1* 中 *AN3* 基因已被敲除 ,同样的 ,突变体 *an3-4* 中也没有扩增条带 ,说明该突变体中 *AN3* 基因的表达缺失 ,突变体 *an3-4* 中 *AN3* 基因已被敲除。以上实验证明 ,我们已经获得了所需要的研究材料。

2.2 突变体表型分析

测量出具体的雄蕊和雌蕊的长度(图 2)。拟南芥为自花授粉植物 ,自花授粉植物必然是兼有雄蕊和雌蕊的完全花 ,而且雌蕊雄蕊基本上同时成

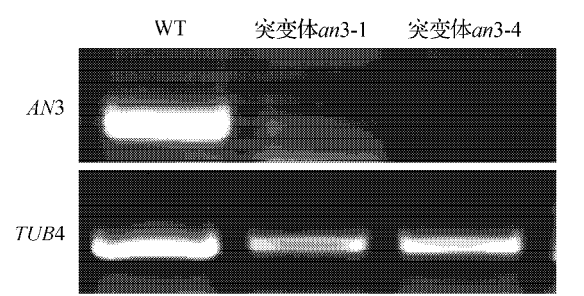


图 1 用 RT-PCR 检测 *AN3* 在 *an3-1* 和 *an3-4* 中的表达情况 WT. 野生型 Col-0 拟南芥 ;*TUB4*. 持家基因 ,作为对照 以此检测 *AN3* 在野生型、突变体 *an3-1* 和突变体 *an3-4* 中的表达量。

Fig. 1 RT-PCR assays *AN3* expression in *an3-1* and *an3-4* mutants WT. Wild-type Col-0 *A. thaliana* ; *TUB4*. Housekeeping gene as a control The expression levels of *AN3* in wild-type ,mutant *an3-1* and mutant *an3-4* were examined.

熟 ,授粉需将花粉从花药到柱头移动。从表型上观察发现野生型(Col-0)植株的雄蕊和雌蕊生长正常 ,即可正常授粉 ,正常繁殖发育 ;然而突变体 *an3-1* 和 *an3-4* 的雄蕊较野生型明显变短 ,突变体 *an3-1* 和 *an3-4* 的雌蕊也较野生型变短 ,但无明显变化。结果初步表明 :*AN3* 基因可能参与拟南芥的花的雄蕊发育的调控。

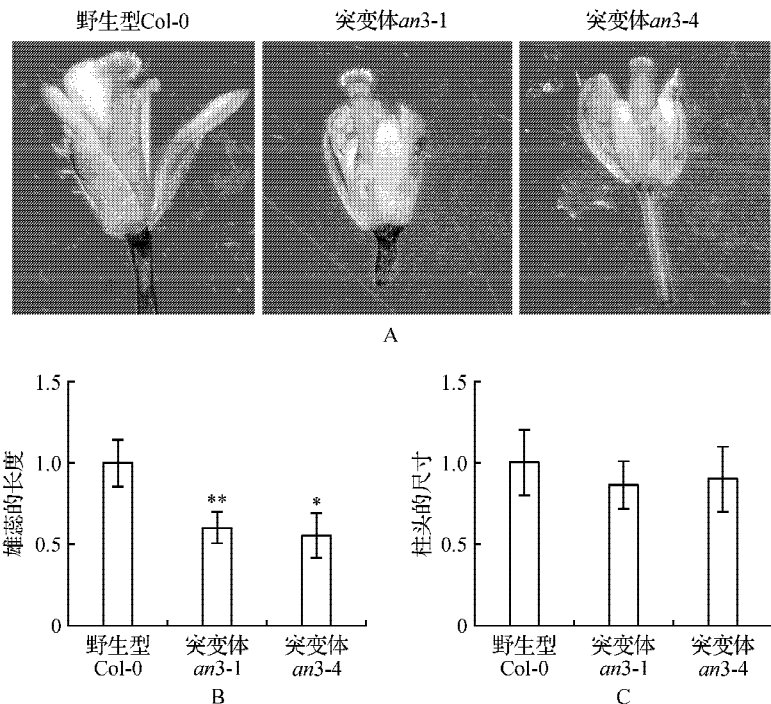


图 2 突变体 *an3-1* 和 *an3-4* 的雄蕊和雌蕊表型特征 A. 野生型和突变体雄蕊的生长状态 ,B. 野生型和突变体雄蕊的长度(以野生型的雄蕊长度为 1.0 $n > 12$; * $P < 0.01$) C. 野生型和突变体雌蕊的长度(以野生型的雄蕊长度为 1.0)

Fig. 2 *AN3* phenotypic characteristics of stamens and pistils in *an3-1* and *an3-4* mutants A. The growth status of wild-type and mutant stamens ;B. The length of wild-type and mutant stamens(Col-0 is set as 1.0 $n > 12$; ** $P < 0.01$) ;C. The length of wild-type and mutant pistil(Col-0 is set as 1.0)

2.3 AN3 基因在种子胚、柱头、成熟的花粉和花瓣均有表达(Pro-AN3-GUS)

以上实验证明 AN3 基因可能对花发育过程有调控作用 ,这必定要求 AN3 基因在花器官中表达。为明确 AN3 基因可能参与拟南芥的生殖发育的调控 ,本研究构建了 AN3 启动子 GUS 表达载体 ,GUS 染色表明 ,拟南芥 AN3 基因在种子胚、柱头、成熟的花粉及花中都能表达(图 3) ,这个结果与 AN3

基因的敲除突变体花器官的发育异常一致。这一结果暗示着该基因可能在整个雄蕊生长过程中发挥着重要的作用。

既然 *an3-1* 和 *an3-4* 的雄蕊变短 ,是否这个异常的表型影响果荚的形成。的确 ,这个发育异常的表型严重地影响了授粉 ,从而导致果荚变小 ,变短(图 4) ,单个果荚内种子数目变少(图 5) ,甚至有的难以形成果荚。这将严重影响产量。

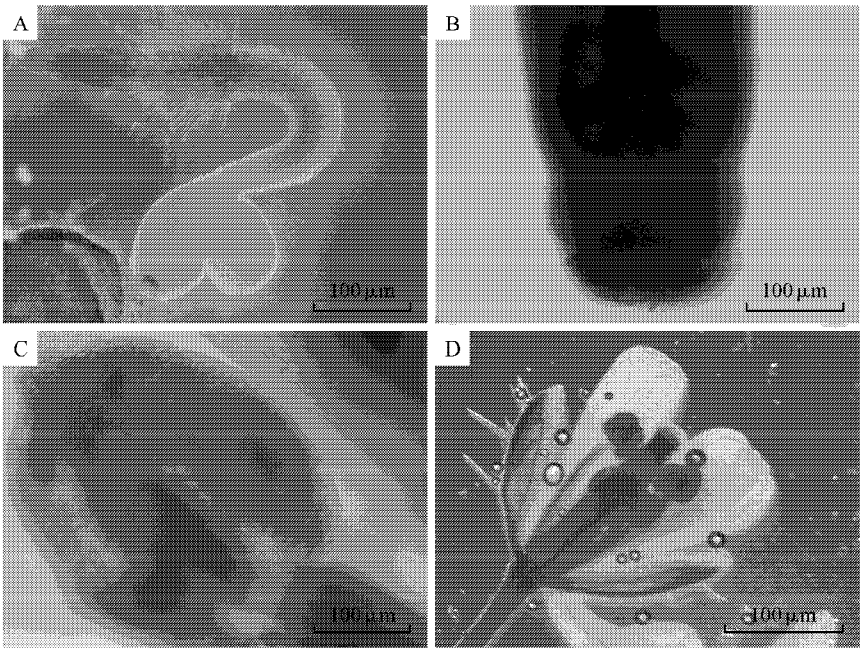


图 3 GUS 染色 A. 拟南芥种子胚中 AN3 的表达 ;B. 拟南芥柱头中 AN3 的表达 ;C. 拟南芥成熟的花粉中 AN3 的表达 ;D. 拟南芥花中 AN3 的表达

Fig.3 GUS staining A. Expression of AN3 in *A. thaliana* seed embryo ;B. Expression of AN3 in stigma of *A. thaliana* ;C. Expression of AN3 in mature pollen of *A. thaliana* ;D. Expression of AN3 in *A. thaliana* flower

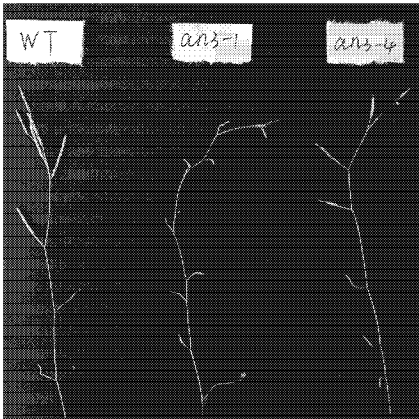


图 4 野生型、*an3-1* 和 *an3-4* 突变体的成熟果荚
Fig.4 Mature silique of *Col-0* *an3-1* and *an3-4* lines

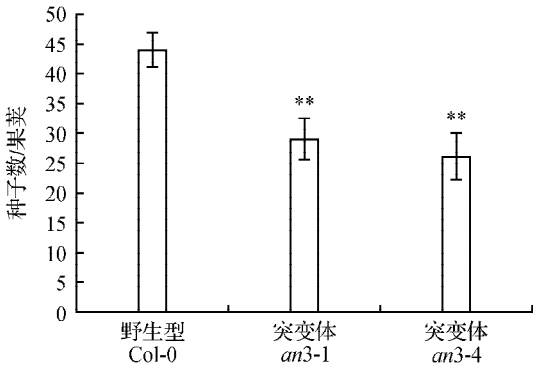


图 5 野生型、*an3-1* 和 *an3-4* 植株中每个果荚含有的种子数
Fig.5 The single silique seed number in *Col-0* *an3-1* and *an3-4* lines

3 讨论

已有研究表明,AN3 对花青素的积累有正向调节作用^[10],AN3 基因仅在叶肉细胞内有表达,在表皮细胞内未检测到^[5],并且 AN3-MIN3 基因级联可通过调控种子胚胎发育控制细胞分裂和细胞伸长^[7]。而本研究发现 AN3 基因在种子胚、柱头、成熟的花粉和花瓣均有表达,证明了 AN3 基因很可能在调控花器官的发育过程中起一定作用。的确 AN3 缺失的突变体的花器官发育异常,主要表现在雄蕊长度较短。何卓娜^[15]等人发现野生型 Col-0 比 *chal cll1 cll2* 三突变体雄蕊的长度明显长,此外,突变体雄蕊的柱头上未看到有黄色成熟花粉的粘附。周韵^[16]等人发现 *ms1521* 突变体的花缺失部分花瓣,雄蕊比较短,花药肥大,部分雄蕊的花药成丝状。成志鹏^[17]研究表明,突变体 *ems1227* 与野生型相比, *ems1227* 突变体的长角果短小,不含种子。这些研究与本实验结果突变体较野生型雄蕊长度短小一致。另外,刘彩霞^[1]等人发现,过量表达 PI 的转基因烟草在花器官中存在明显表型,与野生型相比主要表现为转基因植株花冠变小,雄蕊缩短,果实畸形。AN3 基因的缺失导致拟南芥雄蕊发育的异常,即拟南芥转录共激活子 AN3 调控花的雄蕊的形成,这一结果可能会造成后期花的败育,减少种子数目,影响果实发育,从而造成产量降低。因此,本研究结果对改良农作物育种及增加产量具有十分重要的意义,但是 AN3 作为转录共激活子调控雄蕊形成的下游靶标基因是什么,以及这个调控通路由什么信号所介导都是未知的,需要进一步深入研究。

参 考 文 献

1. 刘彩霞,代丽娟,刘轶,等.拟南芥 *AtPI* 基因植物表达载体的构建及其在烟草中的遗传转化[J].植物研究,2016,36(3):388-394.

Liu C X,Dai L J,Liu Y,et al. Construction of plant expression vector and genetic transformation analysis of *Arabidopsis thaliana AtPI* gene in *Nicotiana tabacum*[J]. Bulletin of Botanical Research 2016,36(3):388-394.

2. 徐义流,张绍玲.花粉-雌蕊相互作用的分子基础[J].西北植物学报,2003,23(10):1800-1809.

Xu Y L,Zhang S L. Molecular basis of pollen-pistil interaction[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2003,23(10):1800-1809.

3. 姜茜.糖与 pH 影响蚕豆花粉萌发率的实验[J].生物学

通报,2001,36(4):43.

JIANG Xi. Effects of sugar and pH on germination rate of *Vicia faba* L. pollen[J]. Bulletin of Biology 2001,36(4):43.

4. Horiguchi G,Kim G T,Tsukaya H. The transcription factor *AtGRF5* and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal 2005,43(1):68-78.

5. Horiguchi G,Nakayama H,Ishikawa N,et al. *ANGUSTIFOLIA3* plays roles in adaxial/abaxial patterning and growth in leaf morphogenesis[J]. Plant Cell Physiology,2011,52(1):112-124.

6. Kanei M,Horiguchi G,Tsukaya H. Stable establishment of cotyledon identity during embryogenesis in *Arabidopsis* by *ANGUSTIFOLIA3* and *HANABA TARANU*[J]. Development 2012,139(13):2436-2446.

7. Meng L S,Wang Y B,Loake G J,et al. Seed embryo development is regulated via an *AN3-MIN3* gene cascade[J]. Frontiers in Plant Science 2016,7:1645.

8. Kim J H,Kende H. A transcriptional coactivator, *AtGIF1*, is involved in regulating leaf growth and morphology in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2004,101(36):13374-13379.

9. Meng L S,Li Y Q,Liu M Q,et al. The *Arabidopsis ANGUSTIFOLIA3-YODA* gene cascade induces anthocyanin accumulation by regulating sucrose levels[J]. Frontiers in Plant Science 2016,7:1728.

10. Meng L S. Transcription coactivator *Arabidopsis ANGUSTIFOLIA3* modulates anthocyanin accumulation and light-induced root elongation through transrepression of *Constitutive Photomorphogenic 1*[J]. Plant,Cell & Environment,2015,38(4):838-851.

11. Meng L S,Yao S Q. Transcription co-activator *Arabidopsis ANGUSTIFOLIA3* (AN3) regulates water-use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density and improving root architecture by the transrepression of *YODA* (YDA)[J]. Plant Biotechnology Journal,2015,13(7):893-902.

12. 高亢,马惠斌,吴立柱,等.拟南芥 *AtCCaP2* 基因缺失突变体的鉴定及表型观察[J].河北农业大学学报,2012,35(5):67-71.

Gao K,Ma H B,Wu L Z,et al. Identification and phenotype of T-DNA insert *AtCCaP2* gene mutant in *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Agricultural University of Hebei,2012,35(5):67-71.

13. Meng L S,Wang Y B,Yao S Q,et al. *Arabidopsis AINTEGUMENTA* mediates salt tolerance by trans-repressing *SCABP8*[J]. Journal of Cell Science 2015,128(15):2919

- 2927.

14. Meng L S ,Wang Z B ,Yao S Q ,et al. The *ARF2-ANT-COR15A* gene cascade regulates ABA signaling-mediated resistance of large seeds to drought in *Arabidopsis*[J]. Journal of cell science 2015 ,128(21) 3922 – 3932.

15. 何卓娜 ,王双双 ,马红 ,等. 胞外多肽激素基因 *CHAL/CLL1/CLL2* 在拟南芥雄蕊发育过程中发挥重要作用 [J]. 植物生理学报 2016 ,52(2) :167 – 176.

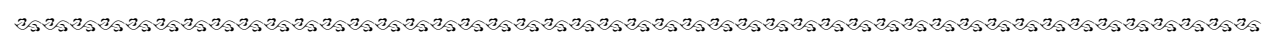
He Z N ,Wang S S ,Ma H ,et al. Peptide hormones *CHAL* , *CLL1* and *CLL2* are important for stamen development in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology Journal ,2016 ,52(2) : 167 – 176.

16. 周鹄 ,贾琦石 ,杨仲南 ,等. 拟南芥雄性不育突变体 *ms1521* 的基因定位[J]. 上海师范大学学报 :自然科学版 2008 ,37(3) 296 – 300.

Zhou Q ,Jia Q S ,Yang Z N ,et al. Genetic mapping of an *Arabidopsis thaliana* male sterile gene *ms1521*[J]. Journal of Shanghai Normal University :Natural Sciences ,2008 ,37 (3) 296 – 300.

17. 成志鹏. 拟南芥心皮发育基因 *MS1522* 的功能分析及雄性不育突变体 *ems1227* 的基因定位[D]. 上海 :上海师范大学 2012.

Cheng Z P. Function analysis of *MS1522* gene involved in *Arabidopsis* carpel development and genetic mapping of *Arabidopsis* male sterile mutant *ems1227* [D]. Shanghai : Shanghai Normal University 2012.



投 稿 须 知

1. 投稿前请登陆本刊网站(<http://bbr.nefu.edu.cn/>)认真阅读本刊投稿中心中的各项说明 ,并按照本刊要求修改和补充论文中的有关内容 ,使论文符合本刊要求。投稿时请附作者单位介绍信或全体作者签名 ,说明无泄密、署名无误和未一稿多投 ,网上投稿请签订版权转让协议。作者自留底稿及软盘备份。
2. 投稿时 ,请登陆本刊网站在线提交论文。投稿后 ,可随时登陆查询稿件处理状况。
3. 稿件如初审通过 ,请作者按要求邮寄已签名的《版权转让协议》。
4. 稿件经过外审和编审后 ,如符合我刊要求 ,须交寄发表费 ,待发表费收到后 ,作者可登陆本刊网站后 ,在发稿状态下打印《稿件录用通知》。
5. 作者文责自负。本编辑部对来稿可做必要修改。
6. 稿件一经发表 ,酌致稿酬 ,并赠样刊 2 本。
7. 凡在本刊发表的论文 ,如荣获省部级以上成果奖 ,请及时通知本编辑部 ,并提供获奖证书复印件。

《植物研究》编辑部